

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE VEGETAL *SALVIA*
OFFICINALIS

ROBERTA BATTISTOTTI PIMPÃO

Florianópolis

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE VEGETAL *SALVIA*
OFFICINALIS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado por ROBERTA BATTISTOTTI
PIMPÃO para obtenção do Grau de Bacharel em Química.

Orientador: Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti

Florianópolis
2007

Dedico este trabalho a meus pais
Roberto e Rita, e aos meus irmãos
Rodrigo e Ricardo.

Agradecimentos

A Deus porque sozinha eu não seria capaz.

Ao professor Moacir Geraldo Pizzolatti pela orientação e pelo incentivo.

Aos membros da banca, pela contribuição.

Aos meus pais Roberto e Rita pela educação e ensinamentos que me passaram ao longo da minha caminhada e pela compreensão e apoio nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos Rodrigo e Ricardo pelo companheirismo nesta fase da minha vida.

Aos amigos de laboratório Heros, Cristian, Fabiana, Analice, Aline, Andressa, Munique, Henrique, Michele e Beatriz.

Aos professores e funcionários do Curso de Graduação em Química pelo apoio, colaboração e valiosa convivência que contribuiu para minha formação.

Aos inúmeros amigos que participaram de forma indireta nesta caminhada.

SUMÁRIO

<u>SUMÁRIO.....</u>	<u>v</u>
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos.....	1
1.2 O metabolismo vegetal.....	3
1.3 Toxicidade vegetal.....	4
1.4 Espécie vegetal <i>Sálvia officinalis</i>	6
1.5 Terpenos.....	8
1.6 OBJETIVOS.....	11
1.6.1 Objetivo Geral.....	11
1.6.2 Objetivo Específicos	11
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	12
2.1 Estudo fitoquímico da espécie vegetal <i>Salvia officinalis</i>	12
2.1.1 Materias.....	12
2.1.2 Métodos e instrumentação.....	13

2.1.2.1 Espectroscopia de infravermelho.....	13
2.1.2.2 Ressonância magnética nuclear.....	13
2.1.3 Obtenção dos extratos.....	14
2.1.4 Isolamento dos compostos das folhas de <i>Salvia officinalis</i>	14
2.1.5 Teste de toxicidade frente <i>Artemia salina</i>	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
3.1 Estudo fitoquímico da espécie vegetal <i>Salvia officinalis</i>	19
3.1.1 Identificação do Carnosol.....	20
3.1.2 Identificação do Ácido Oleanólico.....	23
3.1.3 Análise da atividade do Percolado, Extrato bruto e Precipitado.....	24
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
5. BIBLIOGRAFIA.....	27
ANEXOS – Coleção de espectros.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Artemia salina</i>	6
Figura 2	Espécie vegetal <i>Sálvia officinalis</i>	7
Figura 3	Isopreno, núcleo fundamental dos terpenos.	8
Figura 4	Junção de isoprenos.....	9
Figura 5	CCF das substâncias isoladas.....	19
Figura 6	Estrutura química do composto 1 (carnosol).	22
Figura 7	Estrutura química do composto 2 (ácido oleanólico).....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sistema de eluição utilizado para coluna cromatográfica do Percolado.....	16
Tabela 2	Dados experimentais de RMN ^1H e ^{13}C do carnosol registrados em MeOD usando aparelho de 600 MHz para Hidrogênio e 150 MHz para carbono-13.....	22
Tabela 3	Quantidades de <i>Artemia salina</i> que sobreviveram e não sobreviveram ao teste de toxicidade para o precipitado das folhas de <i>Salvia officinalis</i>	24
Tabela 4	Quantidades de <i>Artemia salina</i> que sobreviveram e não sobreviveram ao teste de toxicidade para o extrato bruto das folhas de <i>Salvia officinalis</i>	25
Tabela 5	Quantidades de <i>Artemia salina</i> que sobreviveram e não sobreviveram ao teste de toxicidade para o percolado das folhas de <i>Salvia officinalis</i>	25

LISTA DE ABREVIATURAS

TAS	Toxicidade sobre <i>Artemia salina</i>
PF	Pontos de fusão
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
δ	Deslocamento químico
s	Singlete
d	Duplete
t	Triplete
m	Multiplete
MeOD	Metanol deuterado
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono -13
MHz	Mega Hertz
EtOH	Etanol
CC	Cromatografia em coluna
AcOEt	Acetato de Etila
CCD	Cromatografia de camada delgada
IV	Infravermelho
Fr.	Fração
Rf	Fator de retenção
B. ilinita	<i>Baccharia ilinita</i>
DL ₅₀	Dose de Letal de 50% da população.

RESUMO

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, encontram-se as plantas do gênero *Salvia*, pertencente à família Lamiaceae, contendo aproximadamente 900 espécies, com extensa distribuição em todo o mundo. Desde épocas antigas, muitas espécies deste gênero despertaram o interesse, tendo sido usadas freqüentemente com finalidades medicinais.

A *Salvia officinalis* apresenta inúmeros usos na medicina popular, e apesar disso, sua composição química foi muito pouco investigada e a literatura científica é pobre em informação. Diante desses fatos, este trabalho, teve os seguintes objetivos: 1. reisolar e identificar os compostos das folhas desta planta; 2. separação dos metabólicos secundários presentes no percolado; 3. enfatizar as técnicas de identificação por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C dos constituintes desta espécie vegetal.

Um dos compostos isolados foi reconhecido como sendo um diterpeno através das análises espectroscópicas de IV, RMN de ^1H e ^{13}C , HETCOR COSY e DEPT. A completa elucidação estrutural dos demais compostos requer outras análises espectroscópicas que estão em andamento.

O uso do teste da *Artemia salina* foi utilizado com um primeiro “screening” para determinar a atividade da fração e do extrato da *Salvia officinalis*, ou seja, a toxicidade da planta.

O fracionamento do percolado hidroalcólico das folhas da *Salvia officinalis* resultou no isolamento e identificação do diterpeno carnosol, do triterpeno ácido oleanólico e no isolamento de outros compostos a serem identificados.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos.

O uso de produtos naturais como matéria-prima para a síntese de substâncias bioativas, especialmente fármacos, tem sido amplamente relatado ao longo do tempo. As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para síntese de um grande número de fármacos. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase que inacreditável de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas¹.

Com o desenvolvimento de novas técnicas espectroscópicas, os químicos orgânicos têm conseguido elucidar rapidamente estruturas moleculares complexas de constituintes naturais, até há pouco tempo difíceis de serem identificados. A cada momento são relatadas na literatura novas moléculas, algumas de relevante ação farmacológica, como por exemplo, o taxol, a forskolina, a artemisinina, etc. Neste contexto é importante mencionar que as plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica. Como exemplo, podemos citar a morfina, a emetina, a vincristina, a colchicina, a rutina, etc. Cabe mencionar que dados da

literatura indicaram que, em 1980, os consumidores dos Estados Unidos pagaram mais de 8 bilhões de dólares em prescrições com produtos naturais ativos. Em relação ao mercado mundial, cerca de 80% das pessoas utilizam plantas para curar suas enfermidades.

Outro aspecto a ser ressaltado é a quantidade de plantas existente no planeta, sendo que a maioria é desconhecida sob o ponto de vista científico, onde entre 250-500 mil espécies, somente cerca de 5% têm sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem menor avaliadas sob os aspectos biológicos. A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, ligninas, etc, tem sido objeto de incessantes estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais. Muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de futuramente virem a ser aproveitadas como agentes medicinais².

O Brasil tem a maior biodiversidade do planeta com cerca de 55 mil espécies de plantas conhecidas. A maioria é usada pelo ser humano como fonte de alimento, como matéria-prima para construção, como medicamentos para cura de enfermidades ou no uso de aromatizantes. O Brasil vem sendo alvo de um processo de usurpação de conhecimento tradicional que grupos étnicos e comunidades tradicionais possuem no uso das plantas medicinais; a retirada das plantas medicinais do país para o exterior, as quais retornam na forma de

produtos patenteados, nos leva a pagar caro por uma riqueza nacional. Atualmente, o comércio de medicamentos fitoterápicos brasileiros movimenta cerca de US\$ 260 milhões de dólares ao ano³.

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Muitas vezes essas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas. Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade das plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial. Isto, entretanto, não é verdade. A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública e os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações, toxidez, interações com outras drogas devem ser tratados com cautela. As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda estão no começo, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais⁴.

1.2 O metabolismo vegetal

O metabolismo das plantas é dividido didaticamente em metabolismo primário e metabolismo secundário, mas, na realidade, não existe um limite

definido entre estes dois tipos de metabolismo. LIPÍDIOS, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, metabólicos comuns aos seres vivos e essenciais para a manutenção das células, são originados do metabolismo primário. E as substâncias originadas a partir de rotas biossintéticas diversas, e que estão restritas a determinados grupos de acordo com sua constituição genética, são produtos do metabolismo secundário⁵.

A concentração de princípios ativos na planta depende, naturalmente, do controle genético e dos estímulos proporcionados pelo meio, como por exemplo, fatores climáticos, fatores relacionados com o solo, exposições a microrganismos, insetos, outros herbívoros e poluentes.

Dentre os fatores climáticos, o fotoperíodo (número de horas de luz por dia necessário para que uma planta possa florescer), a temperatura, o "stress" hídrico (deficiência de água no solo) podem determinar em algumas espécies a época ideal de colheita onde poderá se obter uma maior quantidade do princípio ativo desejado⁶.

1.3 Toxicidade vegetal

Muitas toxinas como, por exemplo, os alcalóides, têm sabor amargo e desagradável fazendo com que, em algumas situações, os herbívoros reconheçam e evitem as plantas que as contém. Por outro lado, alguns

metabólicos secundários atuam de maneira oposta, atraindo insetos, pássaros, morcegos e até mesmo ratos, responsáveis pela polinização de muitas plantas. Nesse grupo incluem-se os pigmentos (flavonóides, antocianinas e betalaínas) e óleos voláteis (monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides)⁷⁻⁸.

A avaliação da bioatividade de compostos orgânicos, sejam eles provenientes de plantas ou de síntese, tem sido pouco viável em laboratórios tradicionais de química. Geralmente, a não ser que existam programas de colaboração com biólogos ou farmacólogos, os laboratórios de química não estão adequadamente equipados para a realização de bioensaios de rotina utilizando animais ou tecidos e órgãos isolados. A necessidade de realizar ensaios com procedimentos simples e rápidos, levou à busca de novos testes.

A letalidade de organismos simples tem sido utilizada para um rápido e relativamente simples monitoramento da resposta biológica, onde existe apenas um parâmetro envolvido: morte ou vida. Os resultados podem ser facilmente tratados estatisticamente. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica. Um dos organismos que tem sido utilizado nestes bioensaios é uma espécie de crustáceo marinho, *Artemia salina* Leach⁹.

Muitos laboratórios de Produtos Naturais têm inserido dentre metodologias de isolamento biomonitorado, purificação e elucidação estrutural, ensaios biológicos simples, no intuito de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas. Dentre estes bioensaios, encontra-se a toxicidade sobre *Artemia salina* (TAS), que se caracteriza por ser de baixo custo, rápido e não exigir técnicas assépticas. Inúmeros constituintes bioativos têm sido obtidos de extratos vegetais utilizando este teste na monitoração de estudos fitoquímicos. *Artemia salina* é um microcrustáceo de água salgada que é utilizado como alimento vivo para peixes, sendo seus ovos facilmente encontrados em lojas de aquaristas. A simplicidade do bioensaio TAS favorece sua utilização rotineira, podendo ser desenvolvido no próprio laboratório de fitoquímica¹⁰.



Figura 1: *Artemia salina*

1.4 Espécie vegetal *Sálvia officinalis*

A Sálvia é uma planta semi-arbustiva, que atinge cerca de 80 cm de altura, bastante ramificada. As folhas, de coloração verde acinzentada, aproximam-se

das da hortelã, sendo, no entanto, bem mais compridas do que estas. De superfície rugosa, possuem um pecíolo mais ou menos longo que as une ao caule. As flores da sálvia podem ser violáceas, azuis, róseas ou brancas, surgindo em inflorescência na forma de espiga, nas porções terminais dos ramos. São melíferas e muito procuradas pelas abelhas¹¹.

A *Salvia officinalis* é uma espécie da Família Labiaceae a qual é rica em flavonóides (3%), triterpenos derivados do ursano (ácido ursólico quase sempre, ácido oleanólico), diterpenos (carnosol, ácido carnósico) e ácidos fenólicos (ácido rosmarínico) além de apreciáveis teores de óleo essencial caracterizado por ter cânfora, cineol e cetonas monoterpênicas bicíclicas como as tuionas (são quase 60% do óleo); limoneno, pineno, humuleno, linanol livre e esterificado, bornil. A sálvia de Espanha não contém tuionas e o cineol e a cânfora são os mais comuns, e a outra sálvia citada é rica em linalol (de 10 a 30 %) e esclareol, um diterpeno usado na indústria de perfumes¹².



Figura 2: Espécie vegetal *Salvia officinalis*

1.5 Terpenos

Os terpenos formam uma diversificada família de substâncias naturais. Tradicionalmente, considerou-se como derivados do 2-metil-butadieno, mais conhecido como isopreno. A utilização da regra do isopreno permitiu classificá-los e estudá-los num primeiro momento, no entanto, com o tempo percebeu-se que os terpenos não derivam do isopreno, uma vez que este nunca foi encontrado como produto natural. O verdadeiro precursor dos terpenos é o ácido mevalônico o qual provém da acetil coenzima A. Em qualquer caso, a divisão da estrutura dos terpenos em unidades de isopreno é muito útil e se utiliza com bastante frequência¹³.

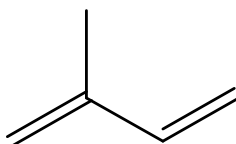


Figura 3: Isopreno, unidade fundamental dos terpenos.

De acordo com o número de cadeias de isopreno presentes, os terpenos são classificados como:

- C₅: hemiterpenos;
- C₁₀: monoterpenos;
- C₁₅: sesquiterpenos;
- C₂₀ até C₄₀: diterpenos .

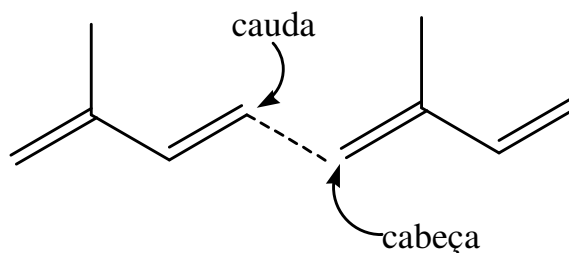


Figura 4: Junção de isoprenos

Estes compostos encontram-se em sementes, flores, folhas, raízes e madeira de plantas superiores assim como no musgo, algas e líquens.

Do ponto de vista químico, são hidrocarbonetos, compostos apenas por carbono e hidrogênio. Alguns são os precursores de certas vitaminas, como A, K, e E¹⁴. Eles apresentam funções variadas nos vegetais. Os monoterpenos são constituintes dos óleos voláteis, atuando na atração de polinizadores. Os sesquiterpenos, em geral, apresentam funções protetoras contra fungos e bactérias, enquanto muitos diterpenóides dão origem aos hormônios de crescimento vegetal. Os triterpenóides e seus derivados, os esteróides, apresentam uma gama de funções. Muitos têm funções de proteção contra herbívoros, alguns são antimitóticos, e outros atuam na germinação das sementes e na inibição do crescimento da raiz¹⁵⁻¹⁶.

Os membros da família Labiáceas, tais como *Salvia officinalis* e *Salvia lavandulafolie* têm uma história longa de uso como agentes de memórias acoplados com propriedades choque-energia que podem ser relevantes à melhora dos déficits congênitos associados com a doença de Alzheimer¹⁷.

O óleo essencial da *Salvia officinalis* é aplicado no tratamento de uma série de doenças incluindo o sistema nervoso central, sistema hematopoético e doenças respiratórias. Embora a infusão da *Salvia officinalis* seja obtido facilmente e usado geralmente para, efeitos da antiperspiração, os antineuralgicos, os anti-sépticos, os hipoglicemiantes e muitos outros usos terapêuticos. Sua composição química foi investigada muito pouco e a literatura científica é pobre na informação a respeito de seus dados químicos¹⁸.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo o estudo fitoquímico da espécie vegetal *Salvia officinalis*.

1.6.2 Objetivos específicos

Descrever os métodos e procedimentos utilizados para o isolamento de compostos do extrato hidroalcólico das folhas de *Salvia officinalis*;

Identificação e caracterização dos compostos isolados utilizando os dados das análises físicas e espectroscópicas tais como infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13.

Avaliar a toxicidade frente *Artemia salina* dos diferentes extratos e frações das folhas de *Salvia officinalis*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos.

O uso de produtos naturais como matéria-prima para a síntese de substâncias bioativas, especialmente fármacos, tem sido amplamente relatado ao longo do tempo. As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para síntese de um grande número de fármacos. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase que inacreditável de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas¹.

Com o desenvolvimento de novas técnicas espectroscópicas, os químicos orgânicos têm conseguido elucidar rapidamente estruturas moleculares complexas de constituintes naturais, até há pouco tempo difíceis de serem identificados. A cada momento são relatadas na literatura novas moléculas, algumas de relevante ação farmacológica, como por exemplo, o taxol, a forskolina, a artemisinina, etc. Neste contexto é importante mencionar que as plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica. Como exemplo, podemos citar a morfina, a emetina, a vincristina, a colchicina, a rutina, etc. Cabe mencionar que dados da

literatura indicaram que, em 1980, os consumidores dos Estados Unidos pagaram mais de 8 bilhões de dólares em prescrições com produtos naturais ativos. Em relação ao mercado mundial, cerca de 80% das pessoas utilizam plantas para curar suas enfermidades.

Outro aspecto a ser ressaltado é a quantidade de plantas existente no planeta, sendo que a maioria é desconhecida sob o ponto de vista científico, onde entre 250-500 mil espécies, somente cerca de 5% têm sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem menor avaliadas sob os aspectos biológicos. A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, ligninas, etc, tem sido objeto de incessantes estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais. Muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de futuramente virem a ser aproveitadas como agentes medicinais².

O Brasil tem a maior biodiversidade do planeta com cerca de 55 mil espécies de plantas conhecidas. A maioria é usada pelo ser humano como fonte de alimento, como matéria-prima para construção, como medicamentos para cura de enfermidades ou no uso de aromatizantes. O Brasil vem sendo alvo de um processo de usurpação de conhecimento tradicional que grupos étnicos e comunidades tradicionais possuem no uso das plantas medicinais; a retirada das plantas medicinais do país para o exterior, as quais retornam na forma de

produtos patenteados, nos leva a pagar caro por uma riqueza nacional. Atualmente, o comércio de medicamentos fitoterápicos brasileiros movimenta cerca de US\$ 260 milhões de dólares ao ano³.

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Muitas vezes essas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas. Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade das plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial. Isto, entretanto, não é verdade. A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública e os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações, toxidez, interações com outras drogas devem ser tratados com cautela. As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda estão no começo, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais⁴.

1.2 O metabolismo vegetal

O metabolismo das plantas é dividido didaticamente em metabolismo primário e metabolismo secundário, mas, na realidade, não existe um limite

definido entre estes dois tipos de metabolismo. LIPÍDIOS, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, metabólicos comuns aos seres vivos e essenciais para a manutenção das células, são originados do metabolismo primário. E as substâncias originadas a partir de rotas biossintéticas diversas, e que estão restritas a determinados grupos de acordo com sua constituição genética, são produtos do metabolismo secundário⁵.

A concentração de princípios ativos na planta depende, naturalmente, do controle genético e dos estímulos proporcionados pelo meio, como por exemplo, fatores climáticos, fatores relacionados com o solo, exposições a microrganismos, insetos, outros herbívoros e poluentes.

Dentre os fatores climáticos, o fotoperíodo (número de horas de luz por dia necessário para que uma planta possa florescer), a temperatura, o "stress" hídrico (deficiência de água no solo) podem determinar em algumas espécies a época ideal de colheita onde poderá se obter uma maior quantidade do princípio ativo desejado⁶.

1.3 Toxicidade vegetal

Muitas toxinas como, por exemplo, os alcalóides, têm sabor amargo e desagradável fazendo com que, em algumas situações, os herbívoros

reconheçam e evitem as plantas que as contém. Por outro lado, alguns metabólicos secundários atuam de maneira oposta, atraindo insetos, pássaros, morcegos e até mesmo ratos, responsáveis pela polinização de muitas plantas. Nesse grupo incluem-se os pigmentos (flavonóides, antocianinas e betalaínas) e óleos voláteis (monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides)⁷⁻⁸.

A avaliação da bioatividade de compostos orgânicos, sejam eles provenientes de plantas ou de síntese, tem sido pouco viável em laboratórios tradicionais de química. Geralmente, a não ser que existam programas de colaboração com biólogos ou farmacólogos, os laboratórios de química não estão adequadamente equipados para a realização de bioensaios de rotina utilizando animais ou tecidos e órgãos isolados. A necessidade de realizar ensaios com procedimentos simples e rápidos, levou à busca de novos testes.

A letalidade de organismos simples tem sido utilizada para um rápido e relativamente simples monitoramento da resposta biológica, onde existe apenas um parâmetro envolvido: morte ou vida. Os resultados podem ser facilmente tratados estatisticamente. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica. Um dos organismos que tem sido utilizado nestes bioensaios é uma espécie de crustáceo marinho, *Artemia salina* Leach⁹.

Muitos laboratórios de Produtos Naturais têm inserido dentre metodologias de isolamento biomonitorado, purificação e elucidação estrutural, ensaios biológicos simples, no intuito de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas. Dentre estes bioensaios, encontra-se a toxicidade sobre *Artemia salina* (TAS), que se caracteriza por ser de baixo custo, rápido e não exigir técnicas assépticas. Inúmeros constituintes bioativos têm sido obtidos de extratos vegetais utilizando este teste na monitoração de estudos fitoquímicos. *Artemia salina* é um microcrustáceo de água salgada que é utilizado como alimento vivo para peixes, sendo seus ovos facilmente encontrados em lojas de aquaristas. A simplicidade do bioensaio TAS favorece sua utilização rotineira, podendo ser desenvolvido no próprio laboratório de fitoquímica¹⁰.



Figura 1: *Artemia salina*

1.4 Espécie vegetal *Sálvia officinalis*

A Sálvia é uma planta semi-arbustiva, que atinge cerca de 80 cm de altura, bastante ramificada. As folhas, de coloração verde acinzentada, aproximam-se

das da hortelã, sendo, no entanto, bem mais compridas do que estas. De superfície rugosa, possuem um pecíolo mais ou menos longo que as une ao caule. As flores da sálvia podem ser violáceas, azuis, róseas ou brancas, surgindo em inflorescência na forma de espiga, nas porções terminais dos ramos. São melíferas e muito procuradas pelas abelhas¹¹.

A *Salvia officinalis* é uma espécie da Família Labiaceae a qual é rica em flavonóides (3%), triterpenos derivados do ursano (ácido ursólico quase sempre, ácido oleanólico), diterpenos (carnosol, ácido carnósico) e ácidos fenólicos (ácido rosmarínico) além de apreciáveis teores de óleo essencial caracterizado por ter cânfora, cineol e cetonas monoterpênicas bicíclicas como as tuionas (são quase 60% do óleo); limoneno, pineno, humuleno, linanol livre e esterificado, bornil. A sálvia de Espanha não contém tuionas e o cineol e a cânfora são os mais comuns, e a outra sálvia citada é rica em linalol (de 10 a 30 %) e esclareol, um diterpeno usado na indústria de perfumes¹².



Figura 2: Espécie vegetal *Sálvia officinalis*

1.5 Terpenos

Os terpenos formam uma diversificada família de substâncias naturais. Tradicionalmente, considerou-se como derivados do 2-metil-butadieno, mais conhecido como isopreno. A utilização da regra do isopreno permitiu classificá-los e estudá-los num primeiro momento, no entanto, com o tempo percebeu-se que os terpenos não derivam do isopreno, uma vez que este nunca foi encontrado como produto natural. O verdadeiro precursor dos terpenos é o ácido mevalônico o qual provém da acetil coenzima A. Em qualquer caso, a divisão da estrutura dos terpenos em unidades de isopreno é muito útil e se utiliza com bastante frequência¹³.

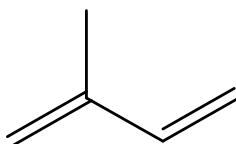


Figura 3: Isopreno, unidade fundamental dos terpenos.

De acordo com o número de cadeias de isopreno presentes, os terpenos são classificados como:

- C₅: hemiterpenos;
- C₁₀: monoterpenos;
- C₁₅: sesquiterpenos;
- C₂₀ até C₄₀: diterpenos .

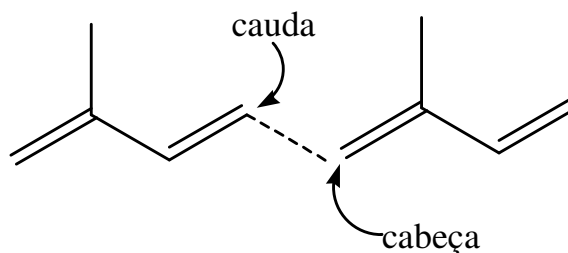


Figura 4: Junção de isoprenos

Estes compostos encontram-se em sementes, flores, folhas, raízes e madeira de plantas superiores assim como no musgo, algas e líquens.

Do ponto de vista químico, são hidrocarbonetos, compostos apenas por carbono e hidrogênio. Alguns são os precursores de certas vitaminas, como A, K, e E¹⁴. Eles apresentam funções variadas nos vegetais. Os monoterpenos são constituintes dos óleos voláteis, atuando na atração de polinizadores. Os sesquiterpenos, em geral, apresentam funções protetoras contra fungos e bactérias, enquanto muitos diterpenóides dão origem aos hormônios de crescimento vegetal. Os triterpenóides e seus derivados, os esteróides, apresentam uma gama de funções. Muitos têm funções de proteção contra herbívoros, alguns são antimitóticos, e outros atuam na germinação das sementes e na inibição do crescimento da raiz¹⁵⁻¹⁶.

Os membros da família Labiáceas, tais como *Salvia officinalis* e *Salvia lavandulafolie* têm uma história longa de uso como agentes de memórias acoplados com propriedades choque-energia que podem ser relevantes à melhora dos déficits congênitos associados com a doença de Alzheimer¹⁷.

O óleo essencial da *Salvia officinalis* é aplicado no tratamento de uma série de doenças incluindo o sistema nervoso central, sistema hematopoético e doenças respiratórias. Embora a infusão da *Salvia officinalis* seja obtido facilmente e usado geralmente para, efeitos da antiperspiração, os antineuralgicos, os anti-sépticos, os hipoglicemiantes e muitos outros usos terapêuticos. Sua composição química foi investigada muito pouco e a literatura científica é pobre na informação a respeito de seus dados químicos¹⁸.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo o estudo fitoquímico da espécie vegetal *Salvia officinalis*.

1.6.2 Objetivos específicos

Descrever os métodos e procedimentos utilizados para o isolamento de compostos do extrato hidroalcólico das folhas de *Salvia officinalis*;

Identificação e caracterização dos compostos isolados utilizando os dados das análises físicas e espectroscópicas tais como infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13.

Avaliar a toxicidade frente *Artemia salina* dos diferentes extratos e frações das folhas de *Salvia officinalis*.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Estudo fitoquímico da espécie vegetal *Salvia officinalis*

2.1.1 Materiais

Os solventes foram adquiridos de fontes comerciais e usados sem prévia purificação. As misturas de solventes foram feitas a volume por volume (v/v) e devidamente recuperados para posterior reutilização.

Nos fracionamentos e separações cromatográficas foi usado gel de sílica de granulometria 0,063-0,2 mm como adsorvente. Assim como, na cromatografia em coluna. Para cromatografia em camada fina (CCF) foram usadas cromatoplasas de alumínio revestidas com gel de sílica 60 de 0,2 mm de espessura da marca Merck.

Os pontos de fusão (PF) foram determinados em um aparelho da Microquímica APF-301 e não foram corrigidos.

No teste de toxicidade foi utilizada uma espécie de crustáceo marinho, *Artemia salina* Leach, em soluções do percolado e do extrato bruto em concentrações diferentes.

O primeiro critério de pureza adotado foi a obtenção de uma única mancha na CCF analítica usando-se diferentes sistemas de eluição e revelado em

Anisaldeído, sob aquecimento e visualização das cromatoplasas em câmara de luz ultravioleta em comprimento de onda de 254 e 365 nm.

2.1.2 Métodos e instrumentação

2.1.2.1 Espectroscopia de infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos em pastilhas de KBr grau espectroscópico, com leituras na região de 4000 a 400 cm^{-1} em um espectrômetro Perkin Elmer FT 16PC, na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC.

2.1.2.2 Ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos a 400 MHz em aparelho Bruker DRX400. Os deslocamentos químicos foram medidos em valores adimensionais δ (ppm), usando-se tetrametilsilano como referencial interno e MeOD como solvente. As áreas relativas dos picos foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades descritas como: s (singlete), d (duplete), t (tripleto), e m (multiplete).

Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos a 100 MHz em aparelho Bruker DRX400, utilizando tetrametilsilano como referencial interno e MeOD como solvente, e com os deslocamentos químicos medidos em unidades adimensionais δ (ppm).

2.1.3 Obtenção dos extratos

As folhas de *Salvia officinalis* (2,000Kg) já secas e trituradas, foram submetidas à extração por percolação com EtOH à temperatura ambiente. O percolado foi filtrado e concentrado em rotavapor sob pressão reduzida a 50°C até 1/3 de seu volume inicial, de forma que o solvente evaporado durante o processo fosse recuperado e retornado ao percolador onde o material foi deixado extrair por maceração durante uma semana para obtenção do extrato bruto. O extrato bruto assim obtido foi concentrado e rotaevaporado até 1/3 de seu volume e deixado em repouso por 24 horas em geladeira, onde ocorre a precipitação das ceras e graxas, removidas posteriormente por filtração.

2.1.4 Isolamento dos compostos das folhas de *Salvia officinalis*

O percolado (154,8g) foi submetido ao fracionamento cromatográfico em coluna (CC) de sílica gel usando como eluente o sistema n-hexano/AcOEt na forma gradiente com polaridade crescente (Tabela 1). Com o objetivo de evitar a

poluição do meio ambiente no descarte dos solventes utilizados e por motivo de economia, executa-se o reaproveitamento destes por evaporação no rotavapor. Assim, numa coluna cromatográfica, a primeira fração colhida é reciclada indefinidamente mediante o ajuste do gradiente de polaridade. Utilizou-se uma coluna de diâmetro 6,0 cm com altura de fase estacionária 11,0 cm e pastilha ou amostra adsorvida em sílica de 3,0 cm. Foram coletadas 62 frações de 150 mL, e reunidas conforme semelhança de seus perfis cromatográficos (CCD).

As frações coletadas de menor polaridade 1-21 não obtiveram boa resolução em cromatografia em camada delgada (CCD) por serem ésteres de cadeia longa, ácidos graxos e pigmentos clorofilicos.

A partir da fração 22 até 30 com eluente na proporção de 15/85 AcOEt / n-hexano o composto carnosol (**1**) (70 mg) foi isolado e submetido a purificação por sucessivas recristalizações com AcOEt.

As frações 31-52 reunidas pelo mesmo método forneceram o ácido oleanólico (**2**) (500 mg), o qual foi identificado por comparação com uma amostra autêntica através de CCD.

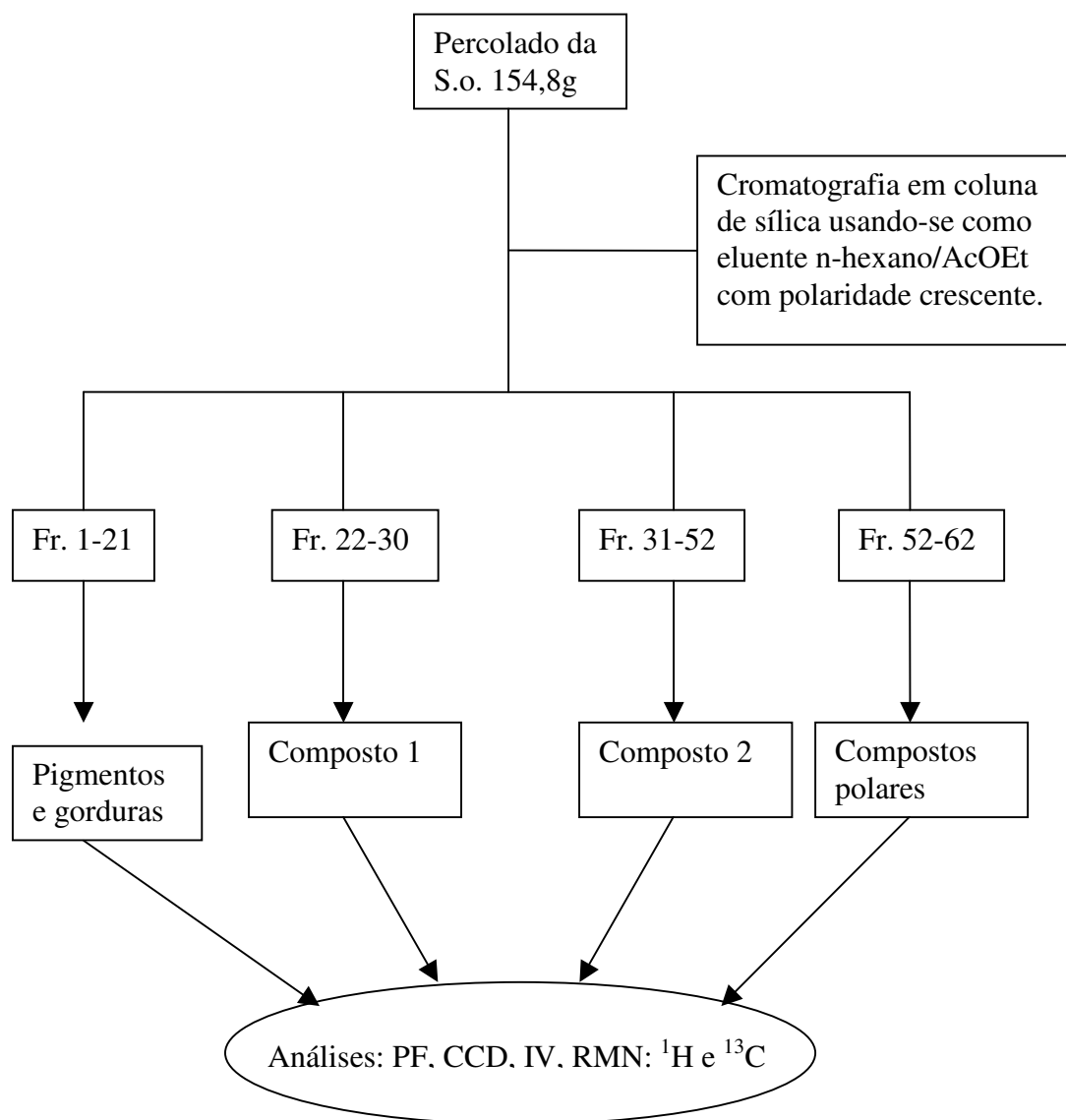
A pureza dos compostos foi baseada na comparação dos seus perfis cromatográficos em relação a padrões isolados e identificados neste mesmo grupo de pesquisa. Outra forma utilizada para certificação de pureza foi o método físico de ponto de fusão, baseando-se em valores com pouca variação na temperatura de mudança do estado físico dos compostos. Além de métodos práticos de CCD e PF para se determinar a pureza de uma amostra utilizou-se

também técnicas sofisticadas de cromatografia líquida de alta eficiência IV, e RMN ^1H e ^{13}C .

Tabela 1: Sistema de eluição utilizado para coluna cromatográfica do Percolado.

Hexano	AcOEt	EtOH	Frações
100	0	-	0
95	5	-	1-8
90	10	-	9-13
85	15	-	14-29
80	20	-	30-38
75	25	-	39-44
70	30	-	45-49
60	40	-	50-54
50	50	-	55-60
60	40	-	61
-	50	50	62

Fluxograma 1



Fluxograma 1: Representação esquemática do isolamento dos compostos do Percolado.

2.1.5 Teste de toxicidade frente *Artemia salina*.

Foram realizados os testes de toxicidade do percolado, precipitado e extrato bruto, em três concentrações diferentes (100,0; 500,0; 1000,0 ppm) e em triplicata.

Os ovos de *Artemia salina* foram colocados para eclodir em água do mar artificial (solução NaCl 3,8%) e deixados em temperatura ambiente por 48 horas com forte aeração e sob continua luminosidade.

Após a eclosão dos ovos adicionou-se as larvas de *Artemia salina* no pocinho juntamente com o extrato e deixou-se incubar por 24 horas para cada experimento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudo fitoquímico da espécie vegetal *Salvia officinalis*

Os sucessivos fracionamentos cromatográficos sobre sílica gel acompanhado de recristalizações do percolado das folhas de *Salvia officinalis* levaram ao isolamento do diterpeno carnosol (**1**) e ao ácido oleanólico (**2**).

As estruturas e purezas dos constituintes químicos foram estabelecidas com base em cromatografia em camada delgada (CCD), e evidências espectroscópicas, principalmente espectroscopia de infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C), envolvendo inclusive comparação com dados encontrados na literatura e com padrões.

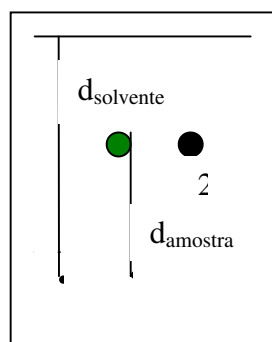


Figura 5: CCD das substâncias isoladas.

$$R_f = d_{\text{am}}/d_{\text{solv}}$$

Mancha 1: carnosol

Mancha 2: ácido oleanólico

3.1.1 Identificação do Carnosol

O composto **1**, foi isolado como cristais incolores com ponto de fusão 234-235 °C, muito próximo ao encontrado na literatura (237°C). O Rf obtido foi de aproximadamente 0,6; sendo o eluente n-hexano/AcOEt - 60:40 (Figura 5).

No espectro de infravermelho foi observada, entre outras, a absorção em 3488 cm⁻¹ referente ao estiramento da ligação O-H de um grupo hidroxila livre e em 3291 cm⁻¹ estiramento de ligação O-H de um grupo hidroxila envolvido em ligação de hidrogênio, em 2952 cm⁻¹ estiramento de ligação C-H, que pela intensidade sugere a presença de vários grupos CH₃, CH₂, e CH. A intensa absorção em 1713 cm⁻¹ refere-se a carbonila de uma lactona. O padrão de absorção do espectro de IV e a relação das intensidades dos estiramentos C-H e C=O são típicos de diterpenos (banda da carbonila mais intensa que a de ligação C-H).

Comparando os espectros de RMN de ¹H e RMN de ¹³C com os valores encontrados na literatura foi possível identificar este diterpeno como sendo o abietano carnosol. Cujas atribuições dos deslocamentos químicos do RMN de ¹H e ¹³C estão apresentados na Tabela 2.

De fato, o espectro de RMN de ¹³C apresentou 20 sinais que juntamente com os espectros DEPT e RMN de ¹H pode-se calcular uma fórmula molecular C₂₀ H₂₆ O₄, compatível com um diterpeno. Calculando o número de insaturações temos 8 insaturações, das quais, uma é devido a carbonila que aparece em

179,40 ppm, quatro são devido a um anel aromático que está caracterizado pela presença dos seis sinais para carbono sp^2 entre 112 e 145 ppm e as três restantes são atribuídas a presença de mais três anéis na estrutura. Estes dados sugerem se tratar de um diterpeno lactona do tipo abietano ou cleistantano.

Os sinais de carbono em 144,7 ppm e 144,5 ppm da região de aromáticos indicam que a estrutura apresenta dois grupos OH vicinais, que juntamente com a presença de apenas um singlete (6,688 ppm) na região de prótons aromáticos, indica que o anel aromático desta estrutura é pentassubstituído (dois OH vicinais, fusão com o anel B e um grupo isopropil, confirmando assim o esqueleto abietano). O grupo isopropil como substituinte do anel aromático pode ser visto nos espectros de RMN de 1H e ^{13}C através dos sinais: 1,19 ppm (2H, d, $J=7,2$ Hz), 1,20 ppm (2H, d, $J=7,2$ Hz), e 3,24 ppm (1H, hepteto, $J=7,2$ Hz) e 20,01 ppm (CH_3), 20,057 ppm (CH_3) e 27,93 ppm (CH). O carbono em 79,7 ppm (CH) que está correlacionado ao hidrogênio 5,4 ppm (1H, dd, $J=4,0$ e 1,2 Hz) indica a presença de um carbono sp^3 oxigenado ligado a um CH_2 (H_a 2,19; H_b 1,84) que por sua vez está conectado a um CH (H 1,69) conforme mostra o espectro Cosy. Estes dados indicam que o anel lactona fecha no carbono 7 do anel B.

Com uma análise mais detalhada dos demais sinais dos RMN de 1H e ^{13}C , juntamente com a análise dos espectros bidimensionais e comparação com os dados da literatura, foi possível confirmar a estrutura deste diterpeno como sendo o abietano carnosol.

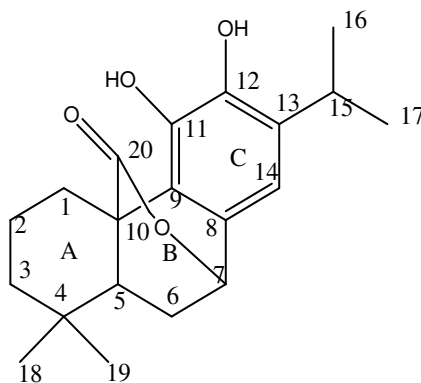


Figura 6: Estrutura química do composto **1** (carnosol).

Tabela 2: Dados experimentais de RMN ^1H e ^{13}C do carnosol registrados em MeOD usando aparelho de 400 MHz para Hidrogênio e 100 MHz para carbono-13.

C	δ_{H}	δ_{C}
1	2.56(td, J=14 e 4,8 Hz); 2.80(dd)	30.12
2	1.50(m); 1,91(dt, J=3,2 e 13 Hz)	20.01
3	1.31(dd, J=3,2 e 13,3 Hz); 1.59(dt)	42.17
4		35.47
5	1.69(q)	47.01
6	2.19(m); 1.84(td, J=1,2 e 10,8 Hz)	30.85
7	5.42(dd, J=1,2 e 4,0 Hz)	79.73
8		136.02
9		122.96
10		49.77
11		144.72
12		144.50
13		133.31
14	6.69(s)	112.50
15	3.05(hept., J=6,8 Hz)	27.93
16	1.19(d, J=7,2 Hz)	23.20
17	1.20(d, J=7,2 Hz)	20.05
18	0.87(3H,s)	32.14
19	0.87(3H,s)	23.20
20		179.40

3.1.2 Identificação do ácido oleanólico

O composto **2** obtido como sólido branco com ponto de fusão 254-256 °C, PF este idêntico ao do ácido oleanólico isolado em nosso laboratório de pesquisa da espécie vegetal *Baccharia ilinita*. O Rf obtido foi de aproximadamente 0,6; sendo o eluente n-hexano/AcOEt - 60:40 (Figura 5)..

No espectro de infravermelho, que também se mostrou idêntico ao do ácido oleanólico isolado de *B. ilinita*, observa-se entre outras, a função ácido carboxílico que é caracterizada pela presença da forte banda de absorção em 1695 cm^{-1} juntamente com a absorção larga e intensa de OH em 3434 cm^{-1} e a presença de uma ligação dupla C=C deduzida do estiramento em 1635 cm^{-1} .

Finalmente, o presente composto foi comparado com uma amostra autêntica de ácido oleanólico em camada delgada com diferentes sistemas de solvente, observando-se em todos os casos a coeluição.

Deste modo, o ácido oleanólico foi identificado através da comparação de suas propriedades físicas e espectroscópicas de IV.

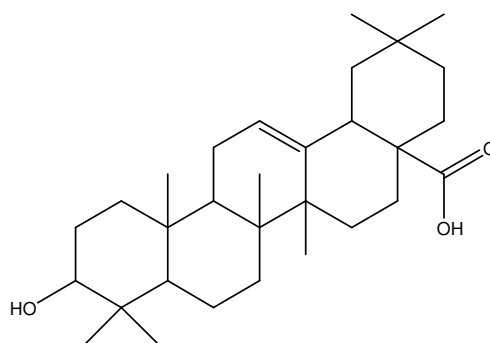


Figura 7: Estrutura química do composto **2** (ácido oleanólico).

3.1.3 Análise da atividade do Percolado, Extrato bruto e Precipitado.

O resultado da atividade foi obtido contando-se o número de larvas de *Artemia salina*, mortas e vivas em cada pocinho através de visualização macroscópica e a análise estatística foi feita da contagem do número de sobreviventes contando-se a porcentagem de mortos (concentração para matar 50% das larvas após o tempo de exposição, a DL₅₀ crônica).

Os compostos pra serem considerados com atividade têm que possuir um DL₅₀ até 1000 ppm. Desta maneira, tanto o precipitado (310,65 ppm), extrato bruto (694,54 ppm), como o percolado (239,42 ppm) apresentaram atividade.

O percolado, por apresentar uma menor DL₅₀, é o que apresenta melhor atividade. Sendo assim, necessita-se de uma dose menor pra matar 50% da população de *Artemia salina* presente no meio.

Tabela 3: Quantidades de *Artemia salina* que sobreviveram e não sobreviveram ao teste de toxicidade para o precipitado das folhas de *Salvia officinalis*.

	100,0 ppm	500,0 ppm	1000,0 ppm
A	6 (4 vivos e 2 mortos)	9 (6 vivos e 3 mortos)	5 (1 vivos e 4 mortos)
B	5 (1 vivo e 4 mortos)	5 (2 vivos e 3 mortos)	7 (7 mortos)
C	8 (7 vivos e 1 mortos)	6 (2 vivos e 4 mortos)	6 (6 mortos)
D	OK	OK	1 morto

Tabela 4: quantidades de *Artemia salina* que sobreviveram e não sobreviveram ao teste de toxicidade para o extrato bruto das folhas de *Salvia officinalis*.

	100,0 ppm	500,0 ppm	1000,0 ppm
A	6 (4 vivos e 2 mortos)	6 (4 vivos e 2 mortos)	5 (4 vivos e 1 mortos)
B	5 (5 vivos)	5 (2 vivos e 3 mortos)	5 (3 vivos e 2 mortos)
C	7 (6 vivos e 1 mortos)	7 (5 vivos e 2 mortos)	5 (1 vivo e 4 mortos)
D	OK	OK	OK

Tabela 5: quantidades de *Artemia salina* que sobreviveram e não sobreviveram ao teste de toxicidade para o percolado das folhas de *Salvia officinalis*.

	100,0 ppm	500,0 ppm	1000,0 ppm
A	6 (2 vivos e 4 mortos)	8 (1 vivos e 7 mortos)	6 (1 vivos e 5 mortos)
B	5 (3 vivos e 2 mortos)	5 (2 vivos e 3 mortos)	5 (4 vivos e 1 mortos)
C	6 (4 vivos e 2 mortos)	5 (2 vivos e 3 mortos)	6 (6 mortos)
D	OK	OK	OK

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora uma planta possa conter centenas de metabólicos secundários, apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica. A análise das substâncias ativas é muito mais complexa e longa, já que geralmente os compostos presentes em menor proporção na planta podem apresentar efeitos biológicos mais intensos.

Os resultados obtidos do estudo fitoquímico da espécie vegetal *Salvia officinalis* foram o isolamento do carnosol (70mg) e ácido oleanóico (500mg).

Demonstrou-se que procedimentos cromatográficos simples são ferramentas eficientes para isolamento e purificação de compostos de produtos naturais.

Estudos de toxicidade auxiliam na triagem de uma grande variedade de compostos com atividade biológica para definir seu potencial de aplicação terapêutica mensurando a toxicidade apresentada dos possíveis futuros fármacos.

Na *Salvia officinalis*, tanto o precipitado (310,65 ppm), extrato bruto (694,54 ppm), como o percolado (239,42 ppm) apresentaram atividade. Sendo o percolado, por apresentar uma menor DL₅₀, o que apresenta melhor atividade. Ou seja, necessita-se de uma dose menor pra matar 50% da população de *Artemia salina* presente no meio.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann,G.; Mello, J.C.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R., orgs.; Farmacognosia: da planta ao medicamento; Ed. Universidade/UFRGS/ Ed.da UFSC: Porto Alegre/ Florianópolis, 1999.
2. Cechinel, V.F.; Yunes, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Química Nova, 21(1), 99-105, 1998.
3. http://www.ibama.gov.br/flora/plantas_medicinais.htm Plantas Medicinais, acessado em novembro de 2006.
4. Veiga, V.F.J.; Pinto, A.C.; Marciel, M.A.M. Plantas Medicinais: cura segura? Química Nova 28(3), 519-528, 2005.
5. <http://br.geocities.com/plantastoxicas/metabolismo.html>, acessado em novembro de 2006.
6. <http://educar.sc.usp.br/biologia/prociencias/medicinais.html>, acessado em novembro de 2006.
7. Harborne, J.B. Advances in chemical Ecology. Nat. Prod. Rep. 10(4), 327 – 348, 1993a.

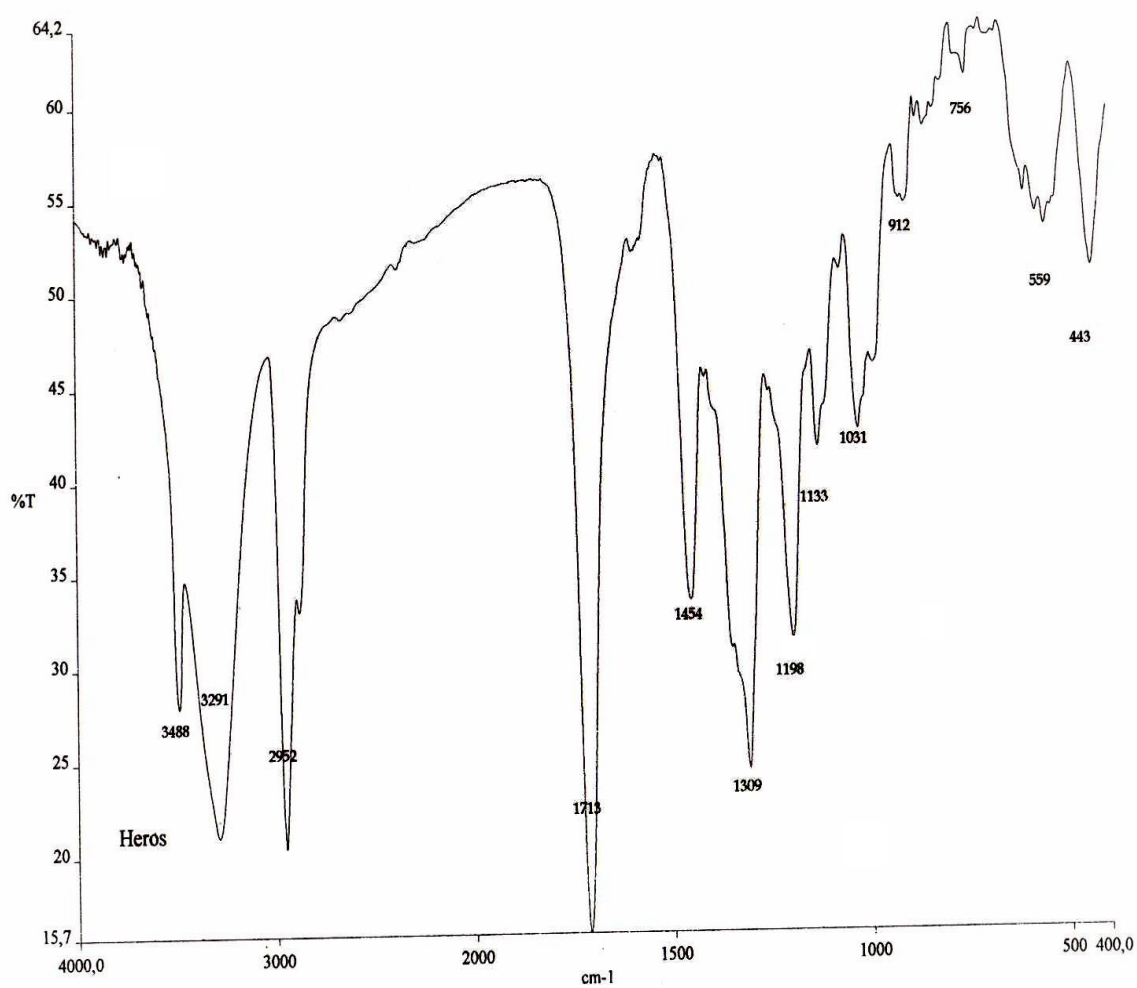
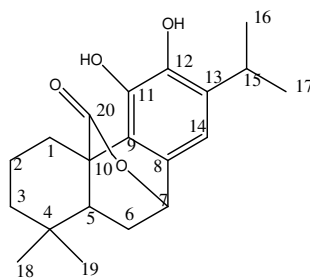
8. Harborne, J.B. The flavonoids in research since 1986. London: Chapman e Hall, 1993b.
9. Cavalcante, M.F.; Oliveira, M.C.C.de; Velandia, J.R.; Echevarria, A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia Salina* leach. *Química Nova*, 23(1), 20-22, 2000.
10. Siqueira, J.M.; Bomm, M.D.; Pereira, N.F.G.; Garcez, W.S.; Boaventura, M.A.D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* Annonaceal biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. *Química Nova* 21 (5), 557-559, 1998.
11. <http://www.herbario.com.br/bot/plantmed/salvia.htm>, acessado em novembro de 2006.
12. Franco, L.C.L.; Leite, R. C. Fitoterapia para a mulher. Corpomente, Curitiba, 375p. 2004.
13. <http://enciclopedia.tiosam.com/enciclopedia/enciclopedia.asp?title=Terpeno>, acessado em dezembro de 2006.
14. <http://pt.wikipedia.org/wiki/Terpeno>, acessado em dezembro de 2006.

- 15.** Harbone, J.B. & Baxter, H. (1995). *Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants*. Taylor & Francis, London.
- 16.** Vickery, M. L. & Vickery, B. (1981). *Secondary Plant Metabolism*. The Macmillan Press Ltd., Hong Kong.
- 17.** Tildesley, N.T.J.; Kennedy, D.O.; Perry, E.K.; Ballard, C.G.; Wesnes K.A. and Scholey A.B. Positive modulation of mood and cognitive performance following administration of acute doses of *Salvia lavandulaefolia* essential oil to healthy young volunteers. *Physiology & Behavior* 83 (5), 699-709, 2005.
- 18.** Radulescu, V.; Chiliment S. and Oprea, E. Capillary gas chromatography–mass spectrometry of volatile and semi-volatile compounds of *Salvia officinalis*. *Journal of Chromatography A*, 1027 (1-2), 121-126, 2003.

ANEXOS

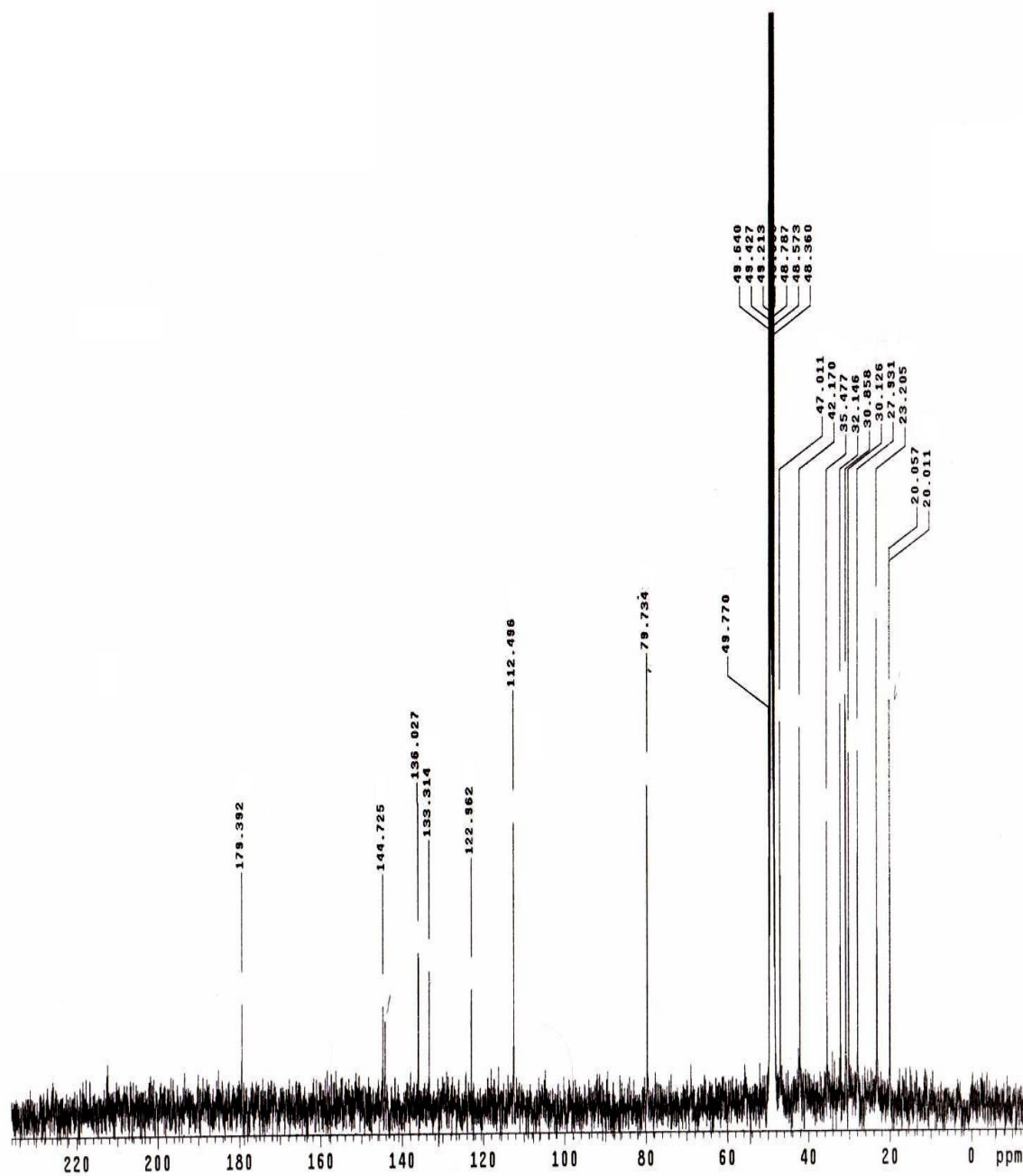
Coleção de espectros

Espectro 1

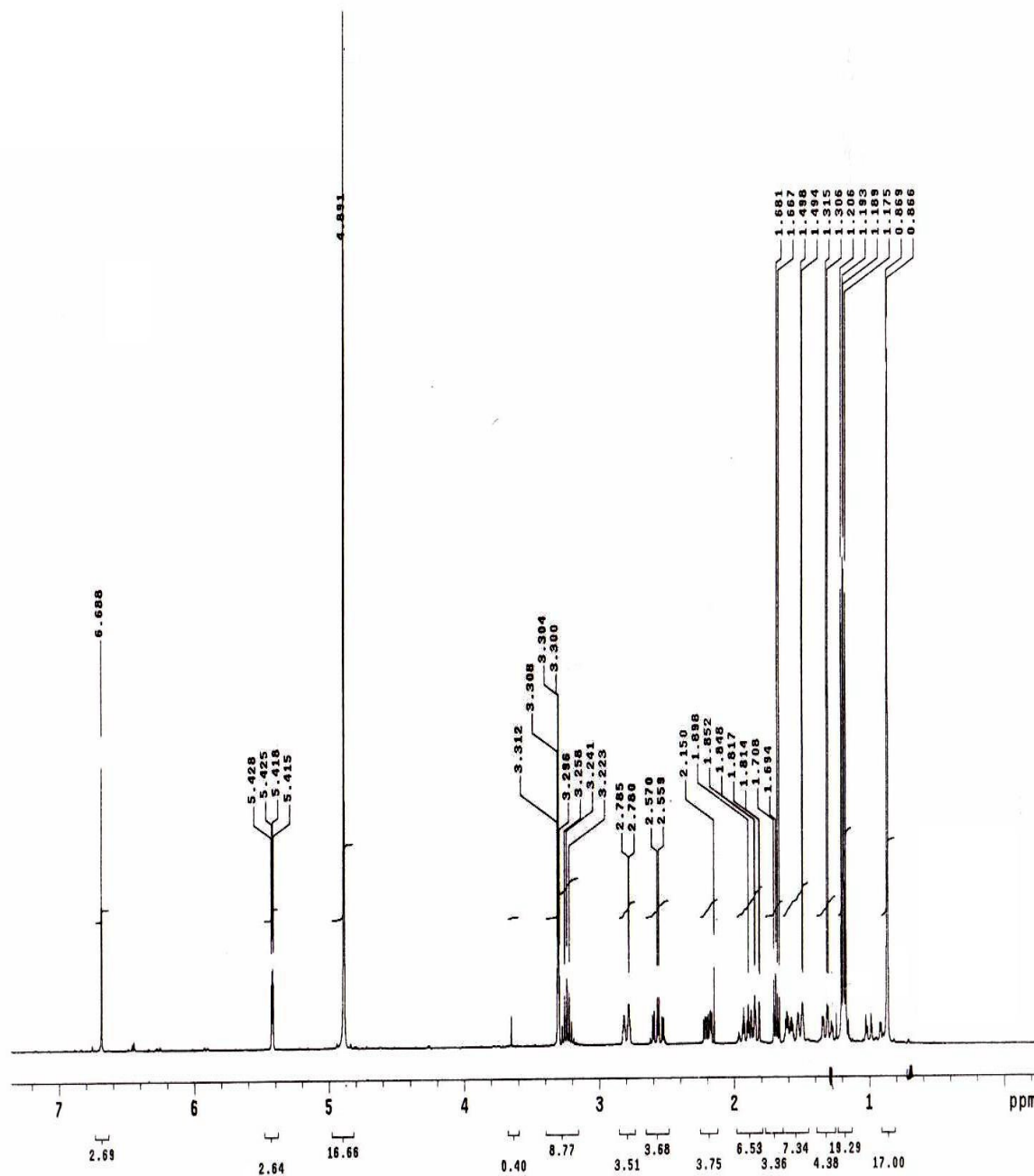


Espectro de IV, em pastilha de KBr., do composto Carnosol (1).

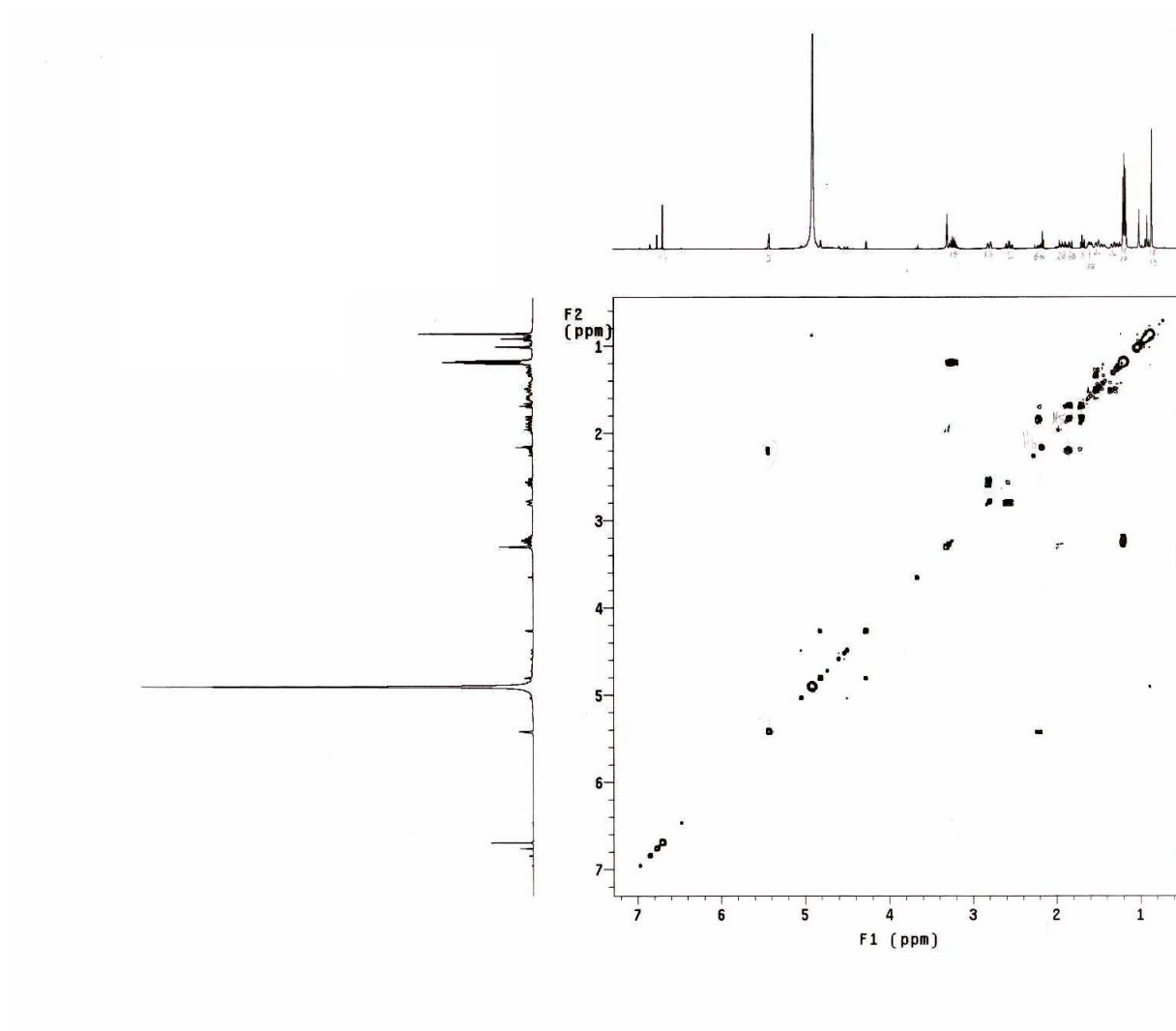
Espectro 2

Espectro de RMN ^{13}C (15 MHz, MeOD) do composto Carnosol (1).

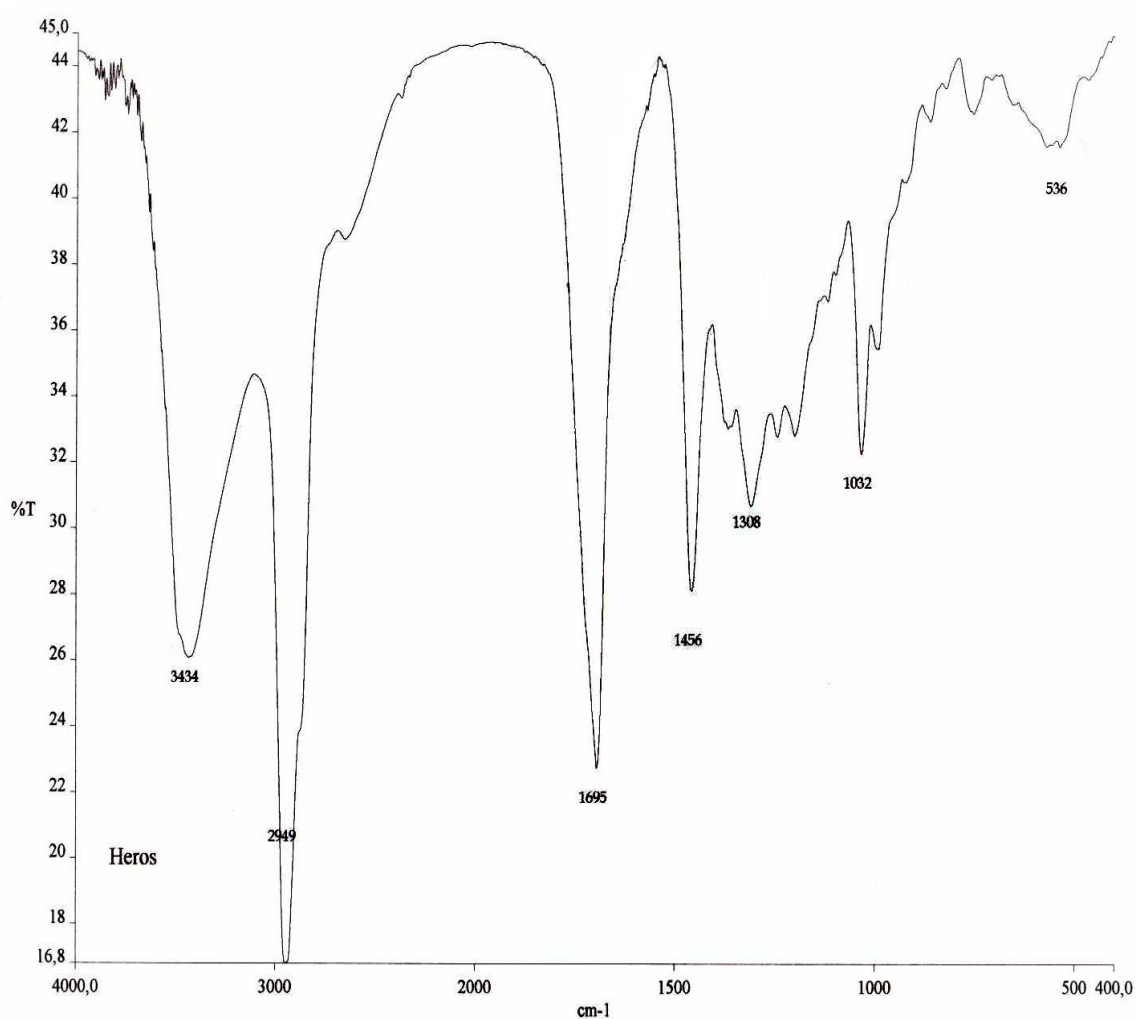
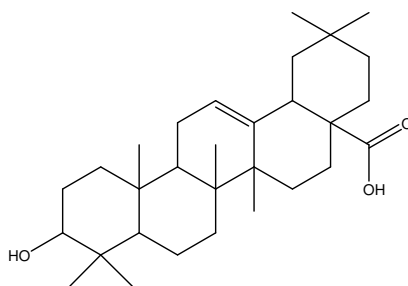
Espectro 3

Espectro de RMN ¹H (400 MHz, MeOD) do composto Carnosol (1).

Espectro 4

Espectro HETCOR COSY do composto Carnosol (**1**).

Espectro 5



Espectro de IV, em pastilha de KBr., do composto Ácido Oleanóico (2).